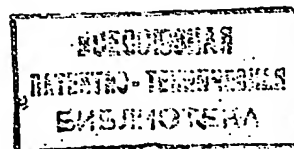




ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ  
ВЕДОМСТВО СССР  
(ГОСПАТЕНТ СССР)

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



1

(21) 4806467/13

(22) 07.02.90

(46) 23.01.93. Бюл. № 3

(71) Всесоюзный научно-исследовательский ветеринарный институт

(72) Н.С. Садыков, Р.Н. Низамов, Д.Ш. Ахмеров, Л.С. Саленко и Г.И. Романов

(56) Гост. 15991-71.

Гост. 15991-86.

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

2

(57) Использование: ветеринария, оценка средств профилактики, сибирская язва. Сущность изобретения: до и после применения испытуемых средств специфической профилактики сибирской язвы животным перорально с кормом вводят инкапсулированную суспензию спор вирулентного штамма возбудителя сибирской язвы в дозе  $(0.75 \cdot 10^9) - (0.90 \cdot 10^9)$  спор. Суспензию спор инкапсулируют в желатиновую капсулу и закладывают в кусок хлеба размером  $(5 \times 5) - (10 \times 10)$  см. 2 табл.

Изобретение относится к ветеринарии, в частности к способам оценки эффективности средств специфической профилактики сибирской язвы с.х. животных.

Известен способ определения иммуногенной активности противосибиреязвенной вакцины СТИ путем контрольного подкожного заражения споровой культурой вирулентного штамма возбудителя сибирской язвы иммунизированных морских свинок (ГОСТ 15991-86) и овец (ГОСТ 15991-71) и подсчетом количества выживших животных.

Однако известный способ, выполненный на лабораторных животных и овцах и эмпирически экстраполированный на крупный рогатый скот, не позволяет достоверно оценить эффективность средств иммунопрофилактики сибирской язвы у крупных животных, поскольку при контрольном подкожном заражении даже неиммунизированного крупного рогатого скота возбу-

дителя сибирской язвы, получить летальный эффект не удается.

Учитывая, что смертельное заражение животных возбудителем сибирской язвы в естественных условиях (на пастбище) происходит через корм (перорально), испытывают пероральный метод контрольного заражения крупного рогатого скота, который бы обеспечивал 100%-ный летальный эффект у интактных (неиммунных к сибирской язве) животных. В случае разработки метода используют его для оценки эффективности испытуемых сибиреязвенных вакцин на крупном рогатом скоте.

Целью изобретения является разработка надежного и достоверного способа определения иммуногенной активности вакцины против сибирской язвы на крупном рогатом скоте.

Для этого осуществляют пероральное введение животным инкапсулированной суспензии спор вирулентного штамма воз-

BEST AVAILABLE COPY

(19) SU (11) 1789218 A1

будителя сибирской язвы с кормом до и после применения вакцины против сибирской язвы и эффект оценивают по критерию ПЗ (процент защиты).

Способ оценки эффективности испытуемой противосибирезавенной вакцины на крупном рогатом скоте состоит из следующих этапов:

1. Иммунизация животных испытуемыми вакцинами против сибирской язвы.

2. Пероральное заражение контрольных (неиммунизированных) и иммунизированных животных возбудителем сибирской язвы в дозах, обеспечивающих 100%-ый летальный эффект у неиммунизированных животных.

3. Оценка эффективности испытуемой вакцины по критерию ПЗ (процент защиты).

На 1-ом этапе проводят отбор животных одинакового возраста (молодняк от 3 до 6 месяцев) или взрослых животных (12 месяцев и старше), формируют из них соответствующие группы (по 6 голов в каждой).

Одну группу животных подкожно иммунизируют испытуемой противосибирезавенной вакциной (инструкция по применению препарата), а другую группу животных не иммунизируют, она служит контролем. Животных обеих групп содержат в одинаковых условиях.

2-ой этап. По истечении соответствующего поствакцинального периода (через 15, 21, 30 дней, 2, 3, 8, 9, 12 месяцев после иммунизации в зависимости от условий и задачи исследования) животных подвергают контрольному пероральному заражению вирулентным штаммом возбудителя сибирской язвы. Пероральный метод заражения включает следующие подэтапы:

а) приготовление инфекционного материала;

б) определение концентрации и жизнеспособных спор;

в) инкапсулирование инфекционного материала и введение его животным через рот (перорально).

Для приготовления инфекционного материала спорую культуру вирулентного референс-штамма возбудителя сибирской язвы "Ч-7" высевают на обычные питательные среды (МПА и МПБ), выращивают 18-24 ч при 36,5-37,5°C. Выросшие культуры идентифицируют согласно общепринятым в микробиологии сибирской язвы методам (морфология, подвижность, капсулообразование, спорообразование).

Для спорообразования культуру, выращенную в термостате при 36,5-37,5°C в течение 18-24 ч, в последующем инкубируют

до полного спорообразования в термостате при 32-33°C.

По истечении 5-6 дней выдерживания в термостате при 32-33°C исходная культура обычно превращается в спорую (95-98% спор), которая является пригодной для дальнейшего использования. Степень спорообразования и концентрацию живых спор в культуре определяют согласно ГОСТу 15991-86, используя оптический стандарт мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича № 10.

Инкапсулирование заражающего материала проводят следующим образом.

Исходную суспензию спор разводят стерильным физиологическим раствором до концентрации  $0,5 \times 10^9$  спор/мл. Суспензию набирают в стерильные пипетки объемом 1-2 см<sup>3</sup> и вносят ее по 0,5 см<sup>3</sup> в быстрорастворимые желатиновые капсулы, употребляемые в медицинской практике для внутреннего применения лекарственных препаратов, выпускаемых отечественной промышленностью. Капсулы представляют собой желатиновые цилиндры емкостью 0,6-0,9 см<sup>3</sup>, диаметром 7-10 мм и высотой 22-30 мм.

Для предотвращения преждевременного растворения капсул в ротовой полости животного и вторичного рассеивания спор возбудителя сибирской язвы капсулы заключают в куски хлеба размером (5х5)-(10х10) см.

Куски хлеба, содержащие инкапсулированные споры в дозе  $0,25 \times 10^9$  спор каждый, скармливают животным по 3 куса на голову. Суммарная доза спор при этом составляет  $0,75 \times 10^9$  спор на одну голову, что является оптимальной, вызывающей 100%-ный летальный исход неиммунизированных (контрольных) животных. Скармливание животным хлеба с инкапсулированным спорным материалом производят до приема ими кормов и воды.

На 3-ем этапе проводят оценку эффективности испытуемой противосибирезавенной вакцины по критерию ПЗ (процент защиты). Для этой цели используют три группы крупного рогатого скота одинакового возраста и породы. Одну группу животных (6 голов) иммунизируют стандартной противосибирезавенной вакциной СТИ, вторую (6 голов) - испытуемой вакциной (ВГНКИ, ВНИИВВиМ и т.д.) согласно инструкциям по применению биопрепаратов, третью группу животных (3 головы) не иммунизируют и она служит контролем.

Через определенный промежуток времени (15, 21, 30 дней, 2, 3, 6, 9, 12 месяцев после иммунизации) животных всех групп (вакцинированных и невакцинированных)

заражают перорально референтным штаммом возбудителя сибирской язвы в абсолютно смертельной дозе ( $ЛД_{100}=0,75 \times 10^9$  спор). За всеми животными ведут наблюдение в течение всего периода, изучая у них клинику, измеряя температуру тела, пульс, дыхание. Учитывают количество павших и выживших в каждой группе животных.

Эффективность испытуемой вакцины оценивают по критерию ПЗ (процент защиты), используя формулу

$$ПЗ = \frac{(K_n - K_i) \times 100}{K_i} \%$$

где ПЗ — процент защиты, %;

$K_n$  — количество выживших животных, гол.;

$K_i$  — количество использованных в опытах животных, гол.;

100 — коэффициент перевода в проценты.

Так, если в группе животных, иммунизированных противосибиреязвенной вакциной СТИ, выжили 5 голов из 6, использованных в опыте, то подставляя соответствующие значения в приведенную формулу, получаем  $ПЗ = 83,4\%$ .

**Пример 1.** Определяют абсолютно смертельные дозы возбудителя сибирской язвы при пероральном введении его неиммунизированному против сибирской язвы крупному рогатому скоту. Для этой цели суспензию спор возбудителя разливают в желатиновые капсулы по 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,45; 0,50  $\times 10^9$  спор в 1 см<sup>3</sup>, капсулы заключают в куски хлеба и скармливают животным по одному, два и три куска на голову. За животными ведут наблюдение в течение 7 суток, при этом учитывают количество павших животных от каждой дозы. Факт гибели животных от сибирской язвы определяют путем приготовления мазков крови из надреза уха павших животных и микроскопирования их в световом и люминесцентном микроскопе.

Результаты опытов по определению оптимальной дозы перорального заражения крупного рогатого скота спорами возбудителя сибирской язвы представлены в табл. 1.

Из материалов таблицы видно, что пероральное введение спор возбудителя в один прием даже в больших дозах (0,90–1,80 млрд спор) не дает 100% — го летального эффекта, в то время как введение дозы  $0,75 \times 10^9$  спор в три приема (в 3-х кусках) обеспечивает 100%-ый летальный эффект. Таким образом, абсолютно смертельная доза спор возбудителя сибирской язвы для крупного рогатого скота при пероральном

заражении составляет  $(0,75-0,90) \times 10^9$  спор на животное.

**Пример 2.** Проводят оценку эффективности однократной подкожной иммунизации крупного рогатого скота стандартной противосибиреязвенной вакциной СТИ путем перорального заражения животных через 15, 21, 30 дней или через 2, 3, 6, 9, 12 месяцев после иммунизации спорами возбудителя сибирской язвы в абсолютно смертельной дозе  $ЛД_{100}=0,75 \times 10^9$  спор. Животных иммунизируют в одинаковом возрасте (3–6 месяцев или 6–12 месяцев) в соответствии с существующими инструкциями по применению биопрепарата. Группу контрольных животных не иммунизируют, но содержат их (иммунизированных и неиммунизированных) в идентичных условиях, обеспечивающих одинаковое кормление, поение, уход и т.д.

Результаты проверки эффективности однократной подкожной иммунизации 3-4-месячного молодняка крупного рогатого скота противосибиреязвенной вакциной СТИ, перорально зараженного через 15 дней, 7 и 13 месяцев после вакцинации, представлены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что стандартная противосибиреязвенная вакцина СТИ, введенная крупному рогатому скоту подкожно в возрасте 3–4 месяцев однократно, создает напряженный иммунитет через 15 дней, через 6–7 месяцев у однократно привитых вакциной СТИ молодняка иммунитет ослабляется ( $ПЗ$  не более 67%), у взрослых животных, однократно иммунизированных вакциной СТИ, вырабатывается достаточно высокий противосибиреязвенный иммунитет ( $ПЗ=100\%$ ).

**Пример 3.** Проводят сравнительную оценку эффективности предлагаемой противосибиреязвенной (штаммы ВГНКИ, ВНИИВВиМ-55 и т.д.) и стандартной вакцины СТИ. Опыты проводят также, как и в примере 2, но лишь с той разницей, что в опыт берут три группы крупного рогатого скота: контрольная (невакцинированная), иммунизированная стандартной вакциной СТИ и вакцинированная испытуемой противосибиреязвенной вакциной (ВГНКИ, ВНИИВВиМ-55). Иммунизацию животных одинакового возраста проводят в соответствии с инструкциями по применению препаратов, кормление и уход — в идентичных условиях, пероральное заражение животных осуществляют по примеру 2.

По результатам опыта учитывают  $ПЗ$  и определяют преимущества или недостатки предлагаемой противосибиреязвенной вакцины. Опыты показывают, что однократное

применение вакцины СТИ обеспечивает надежный противосибиреязвенный иммунитет у взрослого крупного рогатого скота в течение 13 месяцев после вакцинации, что свидетельствует о нецелесообразности двукратной иммунизации взрослого поголовья указанного вида животных против сибирской язвы. В отличие от взрослых животных молодняк крупного рогатого скота, иммунизированный однократно вакциной СТИ, не приобретает достаточного напряженного иммунитета против сибирской язвы (ПЗ через 7 месяцев после применения вакцины СТИ не превышает 67%), что предполагает проведение повторной вакцинации (ревакцинации) молодняка в этом возрасте.

Технико-экономические преимущества предлагаемого способа по сравнению с прототипом заключаются в следующем:

1. Применение перорального контрольного заражения крупного рогатого скота в предлагаемом способе обеспечивает 100%-ую гибель контрольных (невакцинированных) животных, что позволяет достоверно, а не экстраполиционно, как в известном способе, оценить эффективность испытуемой противосибиреязвенной вакцины.

#### Формула изобретения

Способ определения иммуногенной активности вакцины против сибирской язвы крупного рогатого скота, включающий иммунизацию животных исследуемой вакциной с последующим заражением споровой культурой возбудителя и оценкой результатов по количеству выживших животных, отличающийся тем, что, с целью повыше-

2. Предлагаемый способ позволяет разработать рациональную схему применения противосибиреязвенной вакцины СТИ на крупном рогатом скоте, которая в настоящее время применяется двукратно без учета возраста, что предполагает перерасход трудовых и материальных средств.

3. Применение дифференциальной схемы иммунизации вакциной СТИ с учетом результатов контрольного перорального заражения иммунизированных животных в различные периоды после применения вакцины позволит сэкономить значительное количество трудовых и материальных затрат, если учесть, что в настоящее время в стране согласно существующей схеме подвергаются двукратной вакцинации СТИ десятки миллионов голов крупного рогатого скота, значительную часть которых составляет взрослое поголовье. Переход на однократную иммунизацию вакциной СТИ взрослого крупного рогатого скота, обоснованный результатами испытания предлагаемого способа, позволит сэкономить 50% выпускаемой отечественной биопромышленностью дорогостоящей противосибиреязвенной вакцины СТИ.

ния достоверности способа, иммунизируют крупный рогатый скот, а заражение осуществляют перорально споровой культурой в дозе  $0,75 \cdot 10^9 - 0,90 \cdot 10^9$  спор, заключенной в быстрорастворимую желатиновую капсулу, заложенную в кусок хлеба размером  $5 \times 5 - 10 \times 10$  см.

Таблица 1

Доза заражения (количество спор) $K \cdot 10^9$	Одномоментное введение спор (всей дозы в 1 пр.)	Дробное введение всей дозы спор в	
		два приема	три приема
0,30	6/0	6/0	6/1
0,45	6/1	6/2	6/3
0,60	6/2	6/3	6/4
0,75	6/3	6/4	6/6
0,90	6/5	6/5	6/6
1,80	6/5	6/5	6/6

Таблица 2

Группа кр. рог. скота	Возраст, мес.	Доза вакци- ны, мл	Доза зара- жения, млн	Процент защиты вакцины СТИ через		
				15 дн.	7 мес.	13 мес.
Иммуни- зирован- ная	3-4	0.5	$0.75 \cdot 10^9$	100	67	100
Неимму- низированная	3-4	-	$0.75 \cdot 10^9$	0	0	0

BEST AVAILABLE COPY

Редактор Составитель Ю.Кононенко  
Техред М.Моргентал Корректор В.Петраш

Заказ 312 Тираж Подписное  
ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР  
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101

THIS PAGE LEFT BLANK

POWERED BY **Dialog**

**Determining immunogenic activity of cattle anthrax vaccine - by feeding cattle pathogen spore suspension capsules in bread, and comparing test and control group survival**

**Patent Assignee:** VETERINARY RES INST

**Inventors:** AKHMEROV D SH; NIZAMOV R N; SADYKOV N S

**Patent Family (1 patent, 1 country)**

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
SU 1789218	A1	19930123	SU 4806467	A	19900207	199412	B

**Priority Application Number (Number Kind Date):** SU 4806467 A 19900207

**Patent Details**

Patent Number	Kind	Language	Pages	Drawings	Filing Notes
SU 1789218	A1	RU	5	0	

**Alerting Abstract:** SU A1

Determn. involves feeding cattle pathogen spore suspension capsules in bread in  $0.75-0.90 \times 10$  power (9) spore dosage, then comparing test and control gp. survival.

A 100% mortality rate among non-vaccinated control gp. animals is guaranteed with the technique, which enables a rational approach to anti-anthrax immunisation to be developed. On the basis of controlled infection at various times after immunisation (15-30 days, 2-12 months) it was found possible to halve the frequency of vaccination (to a single procedure), thus achieving economies in vaccine prodn. costs.

**USE/ADVANTAGE** - Used in veterinary science, for evaluating prophylactic preparations, specifically anthrax vaccines for cattle. More accurate determn. of anthrax vaccine immunogenicity, leading to reduced frequency of immunisation.

**USE/ADVANTAGE** - In an example, after test animals had been immunised with the specific anthrax vaccine, both test and control gps. were infected by feeding them virulent anthrax pathogen suspensions in dosage of ( $0.75 \times 10$  power(9)) - ( $0.90 \times 10$  power(9)) spores at various times after immunisation (15, 21, 30 days, 2, 3, 6, 9, 12 months). The suspension is encapsulated in fast-dissolving gelatin and inserted in (5 x 5) - (10 x 10) cm pieces of bread. Vaccine effectiveness is assessed from the percentage of protected head.

**International Classification (Main):** A61K-039/00

**Soviet Union**

**Publication Number:** SU 1789218 A1 (Update 199412 B)

**Publication Date:** 19930123

THIS PAGE LEFT BLANK



Assignee: VETERINARY RES INST (VETE-R)

Inventor: SADYKOV N S NIZAMOV R N AKHMEROV D SH

Language: RU (5 pages, 0 drawings)

Application: SU 4806467 A 19900207 (Local application)

Original IPC: A61K-39/00(A)

Current IPC: A61K-39/00(A)

Derwent World Patents Index

© 2006 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 6717139

THIS PAGE LEFT BLANK